

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application No. :

U.S. National Serial No. :

Filed :

PCT International Application No. : PCT/FR00/01574

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, the below named translator, hereby declare that:

My name and post office address are as stated below;

That I am knowledgeable in the French language in which the below identified international application was filed, and that, to the best of my knowledge and belief, the English translation of the international application No. PCT/FR00/01574 is a true and complete translation of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all the statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the patent application issued thereon.

Date: November 23, 2001



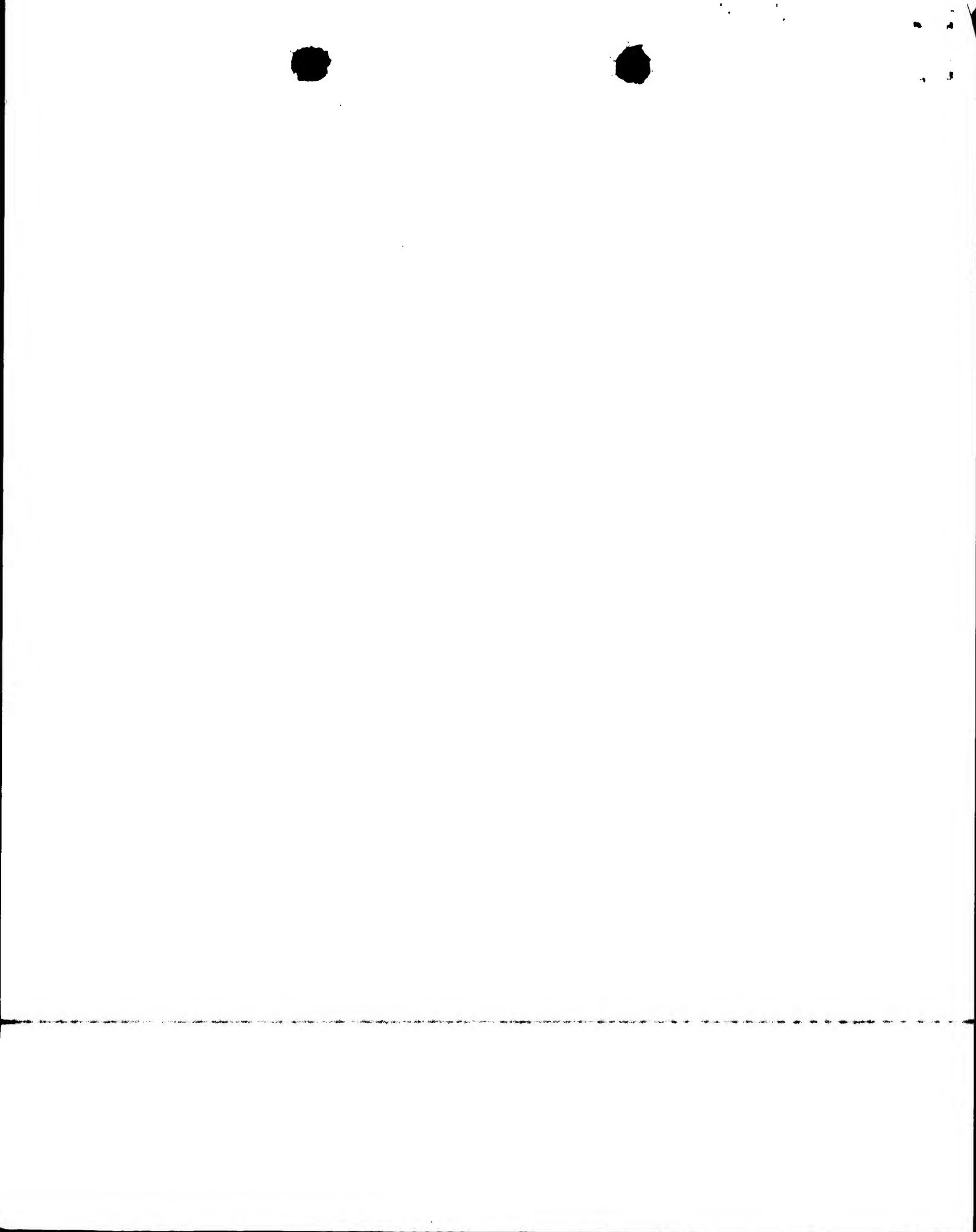
Full name of the translator :

Elaine Patricia PARRISH

For and on behalf of RWS Group plc

Post Office Address :

Europa House, Marsham Way,  
Gerrards Cross, Buckinghamshire,  
England.



PROMOTEUR PERMETTANT L'EXPRESSION DE TRANSGENES DANS  
TOUTE LA PLANTE HORMIS DANS LA GRAINE

5 La présente invention concerne l'isolement et la caractérisation d'un promoteur qui permet l'expression de transgènes dans la plante adulte, à des fins d'amélioration du développement de la plante, sans que le produit de ce transgène soit présent dans la graine mature et sèche. L'invention a également trait aux plantes transgéniques comportant un gène d'intérêt fusionné à ladite séquence promotrice.

10

Les techniques de biologie moléculaires permettent actuellement de modifier le patrimoine génétique des végétaux pour en changer les composantes qui contrôlent la production, la qualité ou la santé. La spécificité d'expression des transgènes introduits repose essentiellement sur l'utilisation de séquences promotrices de plantes ou de  
15 microorganismes. La recherche de promoteurs spécifiques est donc d'une importance capitale pour les biotechnologies végétales. Les graines constituent une composante importante de l'agriculture, en tant que semences, mais également dans l'alimentation ou l'industrie de transformation. A ce titre, la présence de protéines et produits nouveaux dans la graine peut poser des problèmes. Il apparaît donc intéressant de  
20 pouvoir disposer d'un promoteur actif dans tous les tissus végétatifs, mais inopérant dans les graines.

Les caractéristiques d'une graine vont dépendre des interactions entre la maturation, sous contrôle d'un programme génétique spécifique, et des conditions de  
25 l'environnement qui conditionnent pour une bonne part la production ultérieure. Les mécanismes régulateurs de ces phénomènes restent cependant largement incompris. Il existe donc un réel intérêt à maintenir une bonne qualité des lots de semences. Or, le développement des plantes transgéniques posent de nouveaux problèmes, notamment liés à l'expression de gènes hétérologues dans les graines desdites plantes. En effet, la  
30 présence de protéines ou de polypeptides dans les graines peut avoir des conséquences néfastes sur leur capacité à germer ou sur leur qualité. En outre, si la population se familiarise de plus en plus avec l'idée que les plantes comestibles peuvent être

modifiées génétiquement, des graines comestibles contenant le produit de transgènes pourraient ne pas être facilement acceptées.

5 Ainsi, l'objectif à la base de la présente invention est d'identifier un promoteur qui permettrait une expression forte d'un transgène dans tous les tissus des plantes sauf dans la graine.

10 A cet effet, le piégeage de promoteur (« promoter trapping »), un outil puissant pour disséquer des processus développementaux (Topping and Lindsey 1995 pour revue), a été mise en oeuvre. Cette stratégie est basée sur l'utilisation d'un vecteur de transformation des plantes possédant, à l'une de ses extrémités, un gène rapporteur (GUS ou GFP le plus souvent) sans promoteur. Si l'insertion se réalise dans une région codante et si la séquence du gène rapporteur est en phase, il y aura fusion traductionnelle entre la protéine endogène et la protéine du gène marqueur. Les  
15 stratégies de piégeage de gène présentent un avantage majeur vis-à-vis de la mutagenèse insertionnelle classique car le phénotype (expression du gène rapporteur GUS) est dominant. Cette dominance du phénotype (GUS) permet de suivre les allèles mutés à l'état hétérozygote. Ceci est très intéressant pour l'étude de mutations qui sont létales à l'état homozygote. Cette approche permet également de caractériser un gène  
20 par son expression.

Il a été trouvé lors de l'accomplissement de la présente invention, qu'une insertion d'un gène rapporteur dans le gène codant pour une protéine de type « fatty acid hydroxylase » (FAH) d'Arabidopsis conduit à une expression dans tous les tissus de la  
25 plante sauf dans la graine. Ce type de promoteur est d'un très grand intérêt pour des applications biotechnologiques. Il permet de faire exprimer une protéine d'intérêt dès l'imbibition dans tous les tissus de la plante, avec un niveau d'expression élevé, hormis dans la graine. On peut donc, par exemple, protéger une plante contre de nombreux stress biotiques ou abiotiques sans modifier le contenu de sa graine. On peut également  
30 faire exprimer une séquence antisens dirigée contre un gène cible dans tous les tissus  
~~sauf dans la graine.~~

## Description

Ainsi, la présente invention concerne une séquence promotrice permettant l'expression d'un gène d'intérêt dans les tissus d'une plante hormis dans la graine en maturation et  
5 dans la graine sèche, ladite séquence comprenant une séquence ayant au moins 80% d'identité avec la séquence ou une portion de la séquence du promoteur du gène de la FAH d'Arabidopsis.

De préférence, cette séquence comprend une séquence ayant au moins 80% d'identité  
10 avec la séquence ou une portion de la séquence SEQ ID N°1.

On entend par « % d'identité » le pourcentage de nucléotides identiques qui peut facilement être calculé par l'homme du métier en utilisant un programme informatique de comparaison de séquence tel que le programme DNASIS (Version 2.5 pour Windows ; Hitachi Software Engineering Co., Ltd, South San Francisco, CA) en  
15 utilisant les paramètres standards décrits dans le manuel du fabricant, incorporé dans la description par référence.

Dans ce contexte, les séquences et les pourcentages d'identité peuvent également être obtenus en utilisant les ressources informatiques internet. On peut citer le programme Blast (WWW.ncbi.nlm.nih.gov) et le programme FastDB avec les paramètres suivants  
20 « Mismatch penalty 1.00 ; Gap Penalty 1.00 ; Gap Size Penalty 0.33 ; joining penalty 30.0. Ces algorithmes sont présentés dans Current Methods in Sequencing and synthesis Methods and Applications, pages 127-149, 1988, Ala R. Liss, Inc, incorporé dans la description par référence

On peut également définir les séquences ayant 80% d'identité comme étant des  
25 séquences s'hybridant à la séquence SEQ ID N°1 avec des conditions de stringence fortes. Ces conditions sont présentées dans Sambrook et al. Molecular Cloning A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989) aux paragraphes 11.1 à 11.61, incorporés dans la description par référence.

30 Avantageusement, la séquence selon l'invention possède la séquence ou une portion de la séquence SEQ ID N°1 suivante :

5' cagctgtagcatcttgatattgctgatactcagccacaagatcgttcatgttactc  
 tctgcttcattaaactccatctcgtccattccttcttctgtgtaccaatgcaagaaag  
 cttatctcaacatcaggctgatataaccaatatcttacttcttttacatttgtgaaat  
 ggaaccaacccatttttctggaaaaagtgctaaccaaacatttgattaaccgtatcac  
 5 tactactttcatttctatcttctgtttcattatgctgactatttaagctccgttgca  
 aatctctaagttagacataaaagacaaagactaatcaattgtcatcacaccagcgctcg  
 tcgagtgagctatattaatcgtggattttaagcattaaagaaacattctatagtacta  
 aagcaaataaaataattataatcaaacactatgcttgacactggtcacgtgtactggc  
 agtgaatgattctacatcataagaggccgcacataaaatcctaaaaataagcataatga  
 10 attaatcatttacaatttttatttttactcaataagaaaatcgaaagtatgattattat  
 ctagctgccacaatcttcgaatttaataatttactcaagaagagaccgactttaatcct  
 tgacttttctcattgctctatggaaaatgattaaagcagtcaataaaatcttttgacat  
 tgttggcagaagaccaataattcgaagtctaaaatgtaatcgtccacacagtgtatga  
 gtatcctagtattttttttcttttccatataagttgaatttgtaatatatagtgtga  
 15 atgttgtttattttgtggcaacgtacaaaattgggaatcctataagtgcgacgacaagt  
 gacaagacgaggctatgaacagctaattgtatgaagagagccaaaagagcaacaacctg  
 gcacag-3'.

L'invention a également trait à l'utilisation de portion de la séquence SEQ ID N°1  
 20 pour l'identification de fragments capables de promouvoir l'expression d'un gène  
 d'intérêt dans une plante hormis dans la graine. Il est ainsi possible de définir la région  
 minimale de la séquence du promoteur du gène de la FAH pour assurer une expression  
 efficace. En ce sens, le promoteur peut être modifié par addition de séquences telles  
 des enhancers, par délétion de régions non essentielles et/ou non désirées. Le  
 25 promoteur peut comprendre des séquences synthétiques et/ou naturelles.

L'invention concerne un procédé permettant l'isolement et la caractérisation du  
 promoteur du gène de la FAH chez les plantes comprenant les étapes suivantes :

- a) Utilisation d'une amorce comprenant une séquence ayant au moins 80% d'identité  
 30 avec une séquence possédant au moins 10 nucléotides consécutifs de la séquence  
 SEQ ID N°5 ou une séquence complémentaire, une amorce qui s'hybride dans des  
 conditions stringentes fortes à toute séquence codante pour la SEQ ID N°4 ou une

- séquence ayant au moins 80% d'identité avec une séquence possédant au moins 10 nucléotides consécutifs de la séquence génomique du gène de la FAH d'*Arabidopsis* accessible sous le numéro AC003096 ou une séquence complémentaire, pour l'isolement et/ou l'amplification de la séquence en amont de l'extrémité 5' du gène de la FAH,
- b) Clonage et séquençage de la séquence obtenue à l'étape a).

La SEQ ID N°5 correspond à la séquence codante du gène de la FAH d'*Arabidopsis* :

- 10 DEFINITION : ADNc complet de « *Arabidopsis thaliana* fatty acid hydroxylase Fah1p » (FAH1)  
ACCESSION : AF021804  
ORGANISME : *Arabidopsis thaliana*, Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Euphyllophytes; Spermatophyta; Magnoliophyta;  
15 Eudicotyledons; Rosidae; Brassicales; Brassicaceae.

- Référence : Mitchell, A.G. and Martin, C.E, (1997). Fah1p, a *saccharomyces cerevisiae* cytochrome b5 fusion protein, and its *arabidopsis thaliana* homolog that lacks the cytochrome b5 domain both function in the alpha-hydroxylation of sphingolipid-associated very long chain fatty acids ; J. Biol. Chem. 272 (45), 28281-28288  
20 MEDLINE 98019193

- 1 atggttgctc agggattcac tgtggatctt aaaaagcccc ttgtattca gggtggtcat  
61 ctgggagaag attatgagga atgggttcac caacctatcg cgaccaagga aggcctcgg  
25 121 tttttcaga gtgacttttg ggagttcttg acacttacag ttggtgggc agttcctgtc  
181 atttggttgc cagttgtagt ctgggtcata tcaaggctcag taagtatggg atgttcactt  
241 ccagaaatcg tccaattgt tgtcatggga atattcatct ggacattttt tgaatacgtt  
301 cttcaccggt tcgttttcca cataaaaacg aagagttact ggggaaacac tgcacactat  
361 cttattcacg gatgccatca taagcacccg atggaccacc ttcggctcgt ctttctcct  
30 421 actgcaactg cgattttatg ctttccgttc tggaacattg cgaaggctat ctcaactcct

481 tcaaccgcac ctgcattgtt tgggtggagge atgcctggat atgtgatga cgaatgcact  
 541 cattattacc ttcacatgc ccaacctact agaccagtga ccaaaaatct caagaagtac  
 601 cattgaatc atcacttcag gattcaggac aaaggattg gtataacttc gtcgttatgg  
 661 gacatagtct ttgggacact tcccaccaca aaagcccca gaaaagagca atag

5

Il est également possible d'utiliser une amorce comprenant une séquence ayant au moins 80% d'identité avec une séquence possédant au moins 10 nucléotides consécutifs de la séquence génomique du gène de la FAH d'Arabidopsis (introns et exons) qui est accessible à l'homme du métier sous le numéro AC003096 ou une  
 10 amorce qui s'hybride dans des conditions stringentes fortes à toute séquence codante pour la SEQ ID N°4 (Arabidopsis thaliana, fatty acid hydroxylase Fah1p) suivante :

MVAQGFTVDLKKPLVFQVGH LGEDYEEVWHQPIATKEGPRFFQSDFWEFLTL  
 TVWWAVPVIWLPV VVWCISRSVSMGCSLPEIVPIVVMGIFIWTF FEYVLHRFVF  
 15 HIKTKSYWGNTAHYLIHGCHHKHPMDHLRLVFPPTATAILCFPFWNIAKAISTP  
 STAPALFGGGM LGYVMYDVTHYYLHHAQPTRPVTKNLKKYHLNHHFRIQDK  
 GFGITSSLWDIVFGTLPTTKAPRKEQ

Ainsi, la séquence promotrice permettant l'expression d'un gène d'intérêt dans les  
 20 tissus d'une plante, hormis dans la graine en maturation et dans la graine sèche, peut également être caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence ayant au moins 80% d'identité avec la séquence ou une portion de la séquence du promoteur du gène de la FAH susceptible d'être obtenue à partir du procédé décrit précédemment.

25 Un autre aspect de l'invention porte sur une cassette d'expression qui comporte une séquence d'intérêt fusionnée à une séquence comprenant une séquence promotrice telle que définie ci-dessus. Ladite séquence d'intérêt peut coder pour un ARN, une protéine ou un polypeptide qui protège la plante contre un stress biotique ou abiotique.

La cassette peut permettre la co-suppression de l'expression d'un gène caractérisée en  
 30 ce que ladite séquence d'intérêt code pour une protéine ou un polypeptide capable de se substituer à la fonction d'une protéine ou d'un polypeptide endogène. La séquence



d'intérêt peut également coder pour une séquence antisens dirigée contre un gène cible. Ceci permet, en couplant avec la surexpression ectopique d'un gène d'intérêt dans les graines, d'empêcher toute expression de ce gène dans d'autres tissus, l'antisens n'y étant pas exprimé. Ceci s'avère tout à fait utile dans le cas où l'on souhaite

5 surexprimer une protéine dans les graines sans perturber le développement d'autres tissus de la plante.

La cassette selon l'invention peut comprendre en outre un gène marqueur de sélection, une séquence leader contrôlant le transit, la sécrétion ou le ciblage du produit d'expression, dans différents organelles une séquence signal de la terminaison de la

10 transcription et de la traduction.

On entend par « gène d'intérêt » ou « transgène » dans le cadre de l'invention, un gène notamment sélectionné parmi les gènes codant pour une protéine ou un polypeptide qui protège la plante contre un stress biotique ou abiotique, les gènes perturbateurs codant

15 pour un produit capable de se substituer et/ou d'inhiber la fonction ou l'expression d'un ARNm, d'une protéine ou d'un polypeptide endogène. On peut citer par exemple les gènes codant pour des ribozymes contre des ARNm endogènes, des gènes dont le produit de la transcription est au moins complémentaire en partie à un ARNm endogène cible (EP 240 208 incorporé dans la description par référence). On peut

20 également citer des gènes, dont le produit de la transcription est identique ou similaire aux transcripts de gènes endogènes, qui sont capables d'inhiber par co-suppression l'expression desdits gènes endogènes (Napoli C. et al., 1990, The Plant Cell, 2, 279-289, cité dans la description par référence). Bien entendu, le gène selon l'invention peut coder pour une enzyme impliquée dans le métabolisme de sorte à faire produire

25 ou à favoriser la biosynthèse de métabolites, notamment de métabolites utiles pour l'alimentation humaine ou animale ou pouvant affecter le développement. La séquence promotrice selon l'invention peut induire l'expression d'un gène étranger et être utilisée dans différent types de plantes. Le terme « gène étranger » ou « transgène » est également compris comme définissant toute région d'ADN codante ou non (protéine,

30 polypeptide, antisens, ARN catalytique, viroïde etc...). Une protéine d'intérêt pour le développement et la production de la plante peut être produite de façon constitutive dans tous les organes de la plante en utilisant ce promoteur sans que

la composition de la graine soit affectée. Les protéines d'intérêt sont, de manière non exhaustive, celles qui permettent une meilleure protection de la plante vis-à-vis

- des stress biotiques : protection contre les pathogènes, bactéries, champignons, insectes, nématodes, parasites ou ravageurs, protection contre les virus et pathogènes intracellulaires, en particulier ceux qui ne sont pas transmis par les graines
- des stress abiotiques : protection contre la chaleur et le froid, le gel, les stress hydriques tels que la sécheresse ou à l'inverse l'anoxie, la pollution (ozone, SO<sub>2</sub>), la photoinhibition et les stress lumineux, la verse, la phytoremédiation, ou les stress nutritionnels occasionnés par une carence ou excès d'un élément nutritif (en particulier un stress salin).

Tout gène d'intérêt peut donc être placé sous le contrôle de la séquence promotrice isolée. Pour l'expression dans les plantes, ce gène peut comporter également des séquences 3' non transcrites possédant des signaux de polyadénylation actifs chez les plantes. Ces séquences peuvent, par exemple, être celles codant la partie 3' transcrite non traduite du gène l'ARN 35S du virus de la mosaïque de choux fleur (35S CaMV) ou la région 3' non-traduite du gène codant la synthèse de la nopaline (NOS) du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Le gène d'intérêt selon l'invention peut également être un gène contrôlant le développement tel que par exemple un gène impliqué dans le métabolisme des hormones, dans la transduction des signaux, ou dans le contrôle du cycle cellulaire.

Un autre aspect de l'invention a trait à un vecteur, notamment un vecteur plasmidique, comprenant une cassette d'expression telle que définie ci-dessus.

L'invention a également pour objet une cellule de plante transformée avec la cassette ou avec un vecteur comprenant ladite cassette et un kit de transformation de plante comprenant ladite cassette ou ledit vecteur.

La préparation des plasmides, la construction des gènes chimériques et des cassettes d'expression, les restrictions de l'ADN par des endonucléases, la transformation et la confirmation des transformations sont réalisées selon les protocoles standards

(Sambrook et al. 1989. Molecular Cloning Manual Cold Spring Harbor Laboratory, incorporés dans la description par référence).

La construction des vecteurs utilisables pour les expériences de transformation fait partie des techniques de biologie moléculaire connues et pratiquées de façon routinière dans ce champ d'applications.

Un aspect supplémentaire de l'invention porte sur un procédé de préparation de plantes transgéniques dans lesquelles un gène d'intérêt est exprimé dans tous les tissus sauf dans la graine en maturation et dans la graine sèche caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) Transfert d'une cassette ou d'un vecteur selon l'invention dans des cellules de plantes,
- b) Mise en culture des cellules transformées obtenues à l'étape a) de manière à obtenir lesdites plantes transgéniques.

Le transfert de l'ADN à l'intérieur des cellules de plante, notamment des cellules de l'albumen ou des cellules totipotentes dérivées d'embryons immatures, peut être effectué par les techniques standards (Plant Cell Report, 10, 595, 1992), en particulier par transfert via Agrobacterium (Plant J., 1994. 6, 271), par électroporation (Nature, 1987, 327, 70), laserporation (Barley Genetics, 1991 VI, 231), par polyéthylène glycol, ou par la méthode biolistique dite « gun particule » (Nature, 1987, 327, 70). De manière générale, pour les vecteurs de transformations via une agrobactérie (infiltration in planta Bechtold et al. 1993), les vecteurs de transformation portent des marqueurs de sélection, des bordures d'ADN-T, des sites de clonage, des fonctions de réplication, ainsi que d'autres éléments si nécessaire au bon transfert des transgènes (Bouchez et al. 1993). Les publications ci-dessus mentionnée sont incorporées dans la description par références.

La présente invention a également pour objet une plante transgénique susceptible d'être obtenue en mettant en œuvre le procédé mentionnée ci-dessus.

Par « plante susceptible d'être obtenue », on entend toute plante exprimant un transgène dans ses tissus sauf dans les graines matures et sèches, ladite plante possédant un promoteur selon l'invention. Les plantes obtenues par tout procédé équivalent conduisant au même résultat sont également objet de l'invention. La liste  
5 des plantes chez lesquelles cette séquence promotrice peut être utilisée inclue plus particulièrement les plantes qui sont utiles pour toute industrie. On peut citer par exemple le colza, les crucifères, le maïs, le soja, le blé, le tournesol, le pois, les plantes ornementales, et les arbres.

10 Ainsi, l'invention concerne une plante, telle que définie ci-dessus, qui exprime dans ses tissus, sauf dans les graines, un gène dont le produit (ARN ou protéine) protège la plante contre un stress biotique ou abiotique, une séquence antisens dirigée contre un gène cible, une protéine ou un polypeptide capable de se substituer à la fonction d'une protéine ou d'un polypeptide endogène ou une séquence codante pour une protéine  
15 impliquée dans la biosynthèse de métabolites ou un gène contrôlant le développement tel que par exemple un gène impliqué dans le métabolisme des hormones, dans la transduction des signaux, ou dans le contrôle du cycle cellulaire. La plante selon l'invention peut également exprimer une protéine d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur autre que le promoteur du gène de la FAH et une séquence antisens capable  
20 d'inhiber l'expression de ladite protéine d'intérêt sous le contrôle du promoteur du gène de la FAH, de telle sorte que le gène d'intérêt n'est exprimé que dans les graines.

Les graines obtenues à partir d'une plante transgénique selon l'invention, qui ne contiennent donc pas le produit d'expression du transgène, sont visées par la présente  
25 invention, ainsi que leur utilisation en toute industrie.

Pour la suite de la description, on se référera aux légendes des figures présentées ci-dessous.

### Légendes

#### Figure 1 : Structure intro / exon de l'ARNm du gène de la FAH

Les rectangles avec les rayures représentent les introns.

- 5 L'échelle est présentée sur la figure.  
T29F13 est un bac et TAI234 un ADNc.

#### Figure 2 : Structure de la région du gène FAH

PFAH upper et A1 représentent les amorces utilisées pour séquencer le promoteur.

- 10 Les rectangles avec les rayures représentent la partie 5' transcrite non traduite.  
L'échelle est présentée sur la figure.

#### Figure 3 : Carte du plasmide pBI 101

Carte du plasmide pBI101 contenant le promoteur pFAH utilisé.

15

#### Exemple 1 : Clonage du promoteur.

### Matériels et méthodes

#### **20 Isolement de la région promotrice de la FAH.**

- La méthode utilisée pour l'extraction d'ADN génomique d'*Arabidopsis* s'inspire de celle décrite par Doyle et Doyle (1990). Le principe repose sur les propriétés détergentes du bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB; Sigma Chemical Co., USA) permettant la dénaturation spécifique des macromolécules protéiques et polysaccharidiques. Environ 2g de matériel végétal (plantules cultivées in vitro, âgées de 1 à 2 semaines) sont finement broyés dans l'azote liquide et transférés dans un tube de 50ml de type FALCON (Costar, USA), contenant 7.5ml de tampon d'extraction préchauffé à 65 °C. L'extraction s'effectue à 65°C pendant 30 minutes, sous agitation régulière. Les protéines dénaturées par le  $\beta$ -mercaptoéthanol et le CTAB du tampon
- 25 sont ensuite extraites dans un volume de chloroforme puis éliminées après centrifugation (4430g, 10min). Les acides nucléiques du surnageant sont précipités par un volume d'isopropanol en présence d'acétate de sodium 3M (1/10, v/v), centrifugés (7900g, 10min) puis rincés à l'éthanol 70%. Le culot est repris en tube Eppendorf dans
- 30

100µl d'eau et les acides ribonucléiques sont éliminés par l'adjonction de 3µl de Rnase A à 10mg/ml (Sigma Chemical Co., USA). L'ADN est déprotéinisé puis à nouveau précipité à l'éthanol absolu. Après centrifugation en tube Eppendorf, le culot est lavé, séché, repris dans 50 à 100µl d'eau et conservé à -20°C avant analyses.

5

#### **Amplification de l'ADN génomique.**

La séquence promotrice a été amplifiée en utilisant la technologie de la PCR qui est une technique connue (Sambrook et al. 1989). Des amorces correspondantes à la partie 5'(upper) et 3'(lower) de la séquence promotrice ont été dérivées de la séquence génomique du BAC T29F13 (AC003096) (Voir figure 1). De l'ADN génomique d'une lignée de type sauvage (Ler) a été utilisé comme matrice pour l'amplification de la partie promotrice. Les réactions d'amplification ont été menées sur un thermocycleur (MJ Research PTC100 -96), dans des tubes de 0,2ml (Prolabo) contenant le mélange suivant:

15 1 µl (10ng) ADN, 2µl Tampon 10 x (BRL), 2µl MgCl<sub>2</sub> 25mM, 0,8µl dNTP 5mM, 1µl Amorce 1 (10pmole/µl), 1µl Amorce 2 (10pmole/µl), 0,5µl (1U) Taq DNA polymérase (5U/µl), H<sub>2</sub>O qsp 20µl

upper (5'-3') : TTCATGTTACTCTCTGCTTC (SEQ ID N°2)

lower (5'-3') GGAAAGGAAACAAATACGGATTTC (SEQ ID N°3)

20

#### **Transformation bactérienne.**

Les génotypes de bactéries utilisés pour la réalisation des expériences sont :

25 E. Coli souche DH12S (φ80 dlacZ ΔM15 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) araD139 Δ(ara,leu)7697 ΔlacX74 galU galK rpsL deoR nupG recA1/F'proAB+ lacIq ZΔM15).

*Agrobacterium tumefaciens* pmp90C58CE

30 La transformation des bactéries (E.coli souche DH12S) par un plasmide recombiné est réalisée par électroporation (Potter, 1993). Dans une cuve à électroporation (1ml, largeur 0.1cm), 2µl de la réaction de ligature sont mélangés avec 50µl de bactéries décongelées et maintenues dans la glace. La cuve est ensuite placée dans un

électroporateur (Gene Pulser II System; BIO-RAD, FRANCE) et une tension de 1.25kV est appliquée pendant un temps qui est fonction de la résistance ( $200\Omega$ ) et de la capacité ( $25\mu\text{F}$ ) du circuit. Un ml de milieu SOC est ajouté pour favoriser la croissance des bactéries et le tout est incubé dans un tube de 10ml pendant 2 heures à  $37^\circ\text{C}$ , sous agitation rotative (220rpm). Les bactéries transformées sont ensuite étalées sur des boîtes contenant du milieu LB solide supplémenté avec l'antibiotique adéquat et incubées à  $37^\circ\text{C}$  pendant une nuit. La sélection des bactéries transformées par le plasmide pMeca recombiné se fait par 0,04mg/ml d'ampicilline en présence de 0.2mg/ml de X-Gal et de 0.05mg/ml d'IPTG. Pour les autres plasmides recombinés, la sélection des bactéries s'effectue sur un milieu LB avec l'antibiotique adéquat à une concentration finale de 0,04mg/ml.

#### Activité $\beta$ -glucuronidase.

Pour les graines, un semis est effectué sur deux épaisseurs de papier Whatman 1M de 4,7cm (Maindstone, Angleterre) imbibé par 2ml d'eau stérile. Après 48h d'imbibition dans une boîte saturée en eau, les graines sont raclées et placées dans un tube Eppendorf auquel sont ajoutés 100 $\mu\text{l}$  de tampon d'infiltration (100mM de Tampon phosphate pH7,2, 10mM EDTA, Triton X100 0,1% v/v) supplémenté en X-Gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Glucuronic Acid). Le X-Gluc est dissout dans du DMF (diméthylformamide) à une concentration stock: 100 $\mu\text{g}$  (10mg/100 $\mu\text{l}$ ). Le tampon d'infiltration est supplémenté au 1/100e extemporanément avec le stock de X-Gluc. Pour les autres tissus, les échantillons sont placés directement dans le tampon d'infiltration et la coloration est ensuite réalisée selon le même protocole.

L'infiltration est effectuée sous-vide (dans une cloche à vide):

- le vide est cassé 2 fois.
- le vide est maintenu pendant 1 heure, puis les échantillons sont placés à  $37^\circ\text{C}$  pour la nuit.

## Résultats

Des analyses préliminaires ont indiqué qu'une enzyme impliquée dans le métabolisme des lipides (la « Fatty Acid Hydroxylase » : FAH) pourrait avoir une expression  
5 correspondant au type de promoteur ayant les caractéristiques recherchées.

La séquence du gène en question a été obtenue grâce aux séquences provenant du séquençage systématique du génome d'*Arabidopsis thaliana* et se trouve être localisée sur le BACT29F13. Une séquence exprimée (EST TAI234) a été identifiée dans les  
10 bases de données et semble correspondre à une séquence pleine longueur de l'ARNm de la FAH. Ceci a permis l'identification de la séquence 5' transcrite non traduite et de l'emplacement prévu de la séquence promotrice. La structure intron/exon a été déduite, au niveau de la partie transcrite non traduite, de l'alignement du BAC avec l'EST TAI234 (figure 1).

15

Le promoteur a été amplifié par PCR à partir de l'amorce pFAH/upper et l'amorce A1, placé dans la partie 5' transcrite non traduite (figure 2). Une étude de la séquence a montré que la séquence amplifiée possède une boîte TATA putative à -100pb du site d'initiation présumé de la transcription (d'après l'ADNc pleine longueur) et une boîte  
20 CCAAT à -190pb de ce même début de transcription. Le fragment de PCR amplifié (932pb) a été cloné dans un vecteur pGEM-T (PROMEGA), séquencé, puis introduit dans un vecteur binaire (pBI101, Clontech) contenant un gène rapporteur GUS sans promoteur (figure 3). Cette construction a ensuite été introduite par transformation in planta, via *Agrobacterium*, dans des plantes de type sauvage (écotype Ws). Treize  
25 transformants primaires ont été obtenus, qui ont été testés pour leur activité GUS pendant leur développement.



**Exemple 2 : Expression du gène rapporteur sous le contrôle du promoteur de gène de la FAH.**

L'expression est forte dès 20 heures après le début de l'imbibition dans l'embryon.

- 5 Durant le développement, l'expression est forte dans tous les tissus, avec une certaine préférence pour les tissus vasculaires.

Ces résultats démontrent que la séquence promotrice isolée confère bien un profil d'expression très spécifique au gène rapporteur utilisé (GUS). le promoteur est actif tout au long du développement de la plante, dans tous les tissus testés (feuilles, fleurs, tiges, racines etc...) sauf dans la graine en cours de maturation (Voir tableau I ci-dessous).

10

Tableau 1 : Profil d'expression du gène rapporteur GUS

	cotylédons	feuille adulte	Racines	fleur	silique	graines en germination	Graines sèches
1	++	+++	++	++	+++	+++	-
2	+++	+++	++	++	+++	+++	-
3	+++	+++	++	++	nd	++	-
4	+++	+++	++	++	nd	++	-
5	+++	+++	++	++	nd	+++	-
6	+	+++	++	++	nd	+++	-
7	+++	+++	++	++	+++	+	-
8	++	+++	++	++	+++	+++	-
9	+++	+++	++	++	+++	++	-

15

L'expression du marqueur confirme la fonctionnalité du promoteur et sa spécificité. Ce type de promoteur est donc d'un très grand intérêt pour des applications biotechnologiques, telles que l'expression d'une toxine anti-insecte (type Bt) dans les plantes et l'expression de tout transgène permettant d'améliorer, de manière quantitative ou qualitative, le développement et la croissance de la plante sans que la protéine codée par le transgène soit présente dans la graine.

20

REFERENCES

- 5 Bechtold N., Ellis J. and Pelletier G. (1993). In planta Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie; 316: 1194-9
- 10 Bouchez D., Camilleri C. Caboche M. (1993). A binary vector based on Basta resistance for in planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie; 316: 1188-1193
- Doyle J.J. and Doyle J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue . Focus; 12: 13-15
- 15 Sambrook J., Fritsch E. F., and Maniatis T. (1989). . ; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y.

## REVENDICATIONS

1. Séquence promotrice permettant l'expression d'un gène d'intérêt dans les tissus  
5 d'une plante, hormis dans la graine en maturation et dans la graine sèche, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence ayant au moins 80% d'identité avec la séquence ou une portion de la séquence du promoteur du gène de la FAH d'Arabidopsis.
- 10 2. Séquence selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence ayant au moins 80% d'identité la séquence ou une portion de la séquence SEQ ID N°1.
- 15 3. Séquence selon la revendication 2 caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence ou une portion de la séquence SEQ ID N°1.
4. Procédé permettant l'isolement et la caractérisation du promoteur du gène de la FAH chez les plantes comprenant les étapes suivantes :
  - a) Utilisation d'une amorce comprenant une séquence ayant au moins 80% d'identité  
20 avec une séquence possédant au moins 10 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°5 ou une séquence complémentaire, une amorce qui s'hybride dans des conditions stringentes fortes à toute séquence codante pour la SEQ ID N°4 ou une séquence ayant au moins 80% d'identité avec une séquence possédant au moins 10  
25 nucléotides consécutifs de la séquence génomique du gène de la FAH d'Arabidopsis accessible sous le numéro AC003096 ou une séquence complémentaire, pour l'isolement et/ou l'amplification de la séquence en amont de l'extrémité 5' du gène de la FAH,
  - b) Clonage et séquençage de la séquence obtenue à l'étape a).
- 30 5. Séquence promotrice permettant l'expression d'un gène d'intérêt dans les tissus d'une plante, hormis dans la graine en maturation et dans la graine sèche, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence ayant au moins 80% d'identité

avec la séquence ou une portion de la séquence du promoteur du gène de la FAH susceptible d'être obtenue à partir du procédé selon la revendication 4.

- 5 6. Utilisation d'une séquence selon l'une des revendications 1 à 3 et 5 pour l'identification de fragments de la séquence SEQ ID N°1 permettant l'expression d'un gène d'intérêt dans les tissus d'une plante, hormis dans la graine en maturation et dans la graine sèche.
- 10 7. Cassette d'expression caractérisée en ce qu'elle comporte une séquence d'intérêt fusionnée à une séquence comprenant une séquence promotrice selon l'une des revendications 1 à 3 et 5.
- 15 8. Cassette d'expression selon la revendication 7 caractérisée en ce que ladite séquence d'intérêt code pour un ARN, une protéine ou un polypeptide qui protège la plante contre un stress biotique ou abiotique, ou qui est impliquée dans le développement notamment dans le métabolisme des hormones, dans la transduction des signaux, ou dans le contrôle du cycle cellulaire.
- 20 9. Cassette d'expression selon la revendication 7 permettant la co-suppression d'un gène caractérisée en ce que ladite séquence d'intérêt code pour une protéine ou un polypeptide capable de se substituer à la fonction d'une protéine ou d'un polypeptide endogène.
- 25 10. Cassette d'expression selon la revendication 7 caractérisée en ce que ladite séquence d'intérêt code pour une séquence antisens dirigée contre un gène cible.
- 30 11. Cassette d'expression selon la revendication 7 caractérisée en ce que ladite séquence d'intérêt code pour une enzyme impliquée dans la production de métabolites par une plante.
12. Vecteur comprenant une cassette d'expression selon l'une des revendications 7 à 10.
- 35 13. Cellule de plante transformée avec une cassette selon l'une des revendications 7 à 10 ou un vecteur selon la revendication 12.

14. Kit de transformation de plante comprenant une cassette selon l'une des revendications 7 à 10 ou un vecteur selon la revendication 12.
- 5 15. Procédé de préparation de plantes transgéniques dans lesquelles un gène d'intérêt est exprimé dans tous les tissus sauf dans la graine en maturation et dans la graine sèche caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) Transfert d'une cassette selon l'une des revendications 7 à 10 ou d'un vecteur selon la revendication 12 dans des cellules de plantes,
- 10 b) Mise en culture des cellules transformées obtenues à l'étape a) de manière à obtenir lesdites plantes transgéniques.
16. Procédé selon la revendication 15 caractérisé en ce que les cellules sont choisies parmi les cellules embryonnaires provenant d'un embryon immature.
- 15 17. Procédé selon l'une des revendications 15 et 16 caractérisé en ce que le transfert est effectué en utilisant *Agrobacterium*, de préférence *Agrobacterium tumefaciens*.
18. Plante transgénique susceptible d'être obtenue en mettant en œuvre le procédé selon l'une des revendications 15 à 17.
- 20 19. Plante selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle exprime dans ses tissus, sauf dans les graines matures et sèches, un ARN, une séquence antisens dirigée contre un gène cible.
- 25 20. Plante selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle exprime dans ses tissus, sauf dans les graines matures et sèches, un ARN, une protéine ou un polypeptide capable de se substituer à la fonction d'une protéine ou d'un polypeptide endogène.
- 30 21. Plante selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle exprime une protéine d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur autre que le promoteur du gène de la FAH et une séquence antisens capable d'inhiber l'expression de ladite protéine d'intérêt sous le contrôle du promoteur du gène de la FAH, de telle sorte que la protéine d'intérêt n'est exprimée que dans les graines.

22. Plante selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle exprime dans ses tissus, sauf dans les graines matures et sèches, une séquence codante pour une protéine impliquée dans la biosynthèse de métabolites, pour une protéine ou un polypeptide qui protège la plante contre un stress biotique ou abiotique, une protéine contrôlant le développement notamment dans le métabolisme des hormones, dans la transduction des signaux, ou dans le contrôle du cycle cellulaire.
- 5
23. Plante selon l'une des revendications 18 à 22 caractérisée en ce qu'elle est choisie notamment parmi le colza, les crucifères, le maïs, le soja, le blé, le tournesol, le pois, les plantes ornementales, et les arbres.
- 10
24. Graines obtenues à partir d'une plante transgénique selon l'une des revendications 18 à 23 caractérisées en ce qu'elles ne contiennent pas le produit d'expression du transgène.

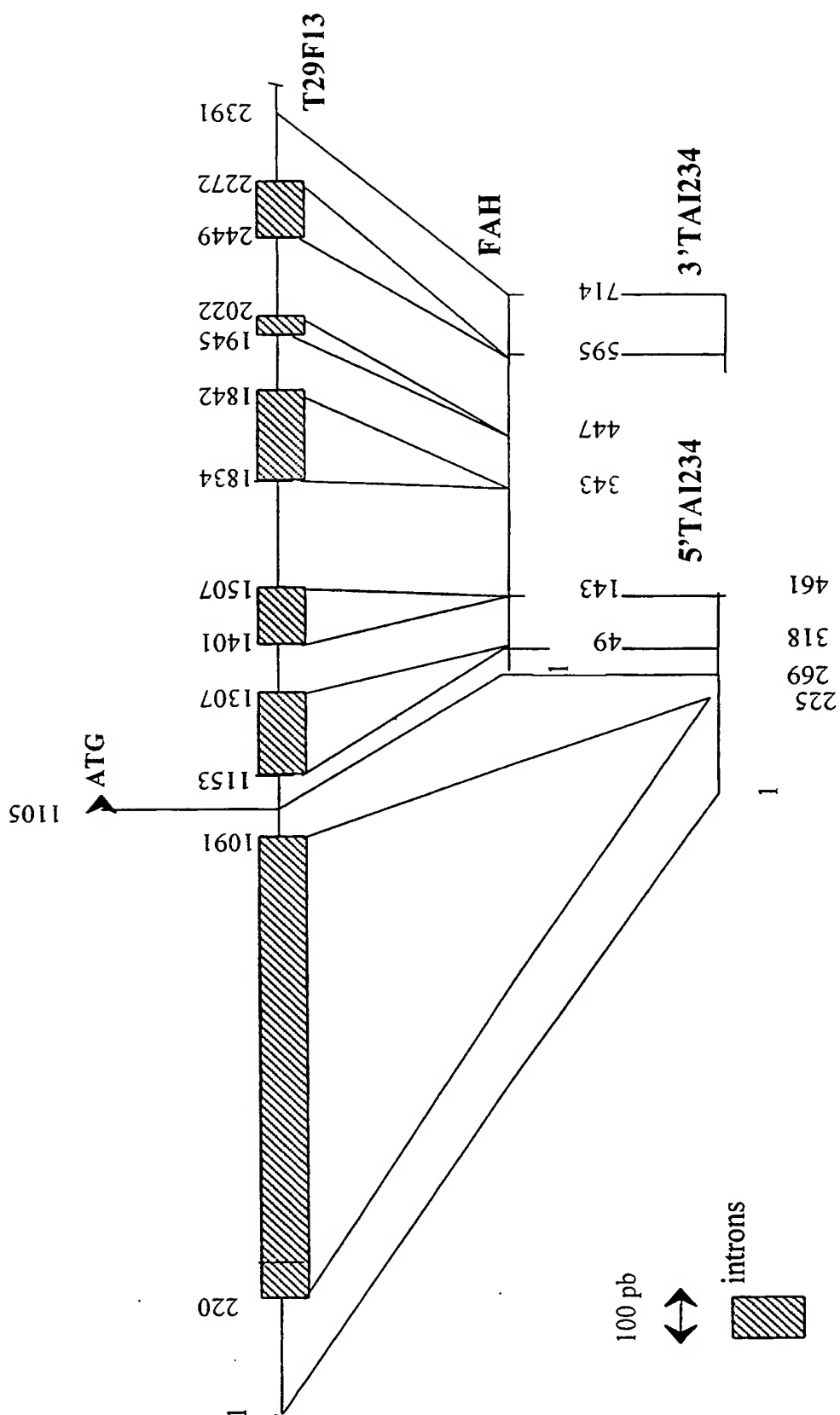


FIGURE 1





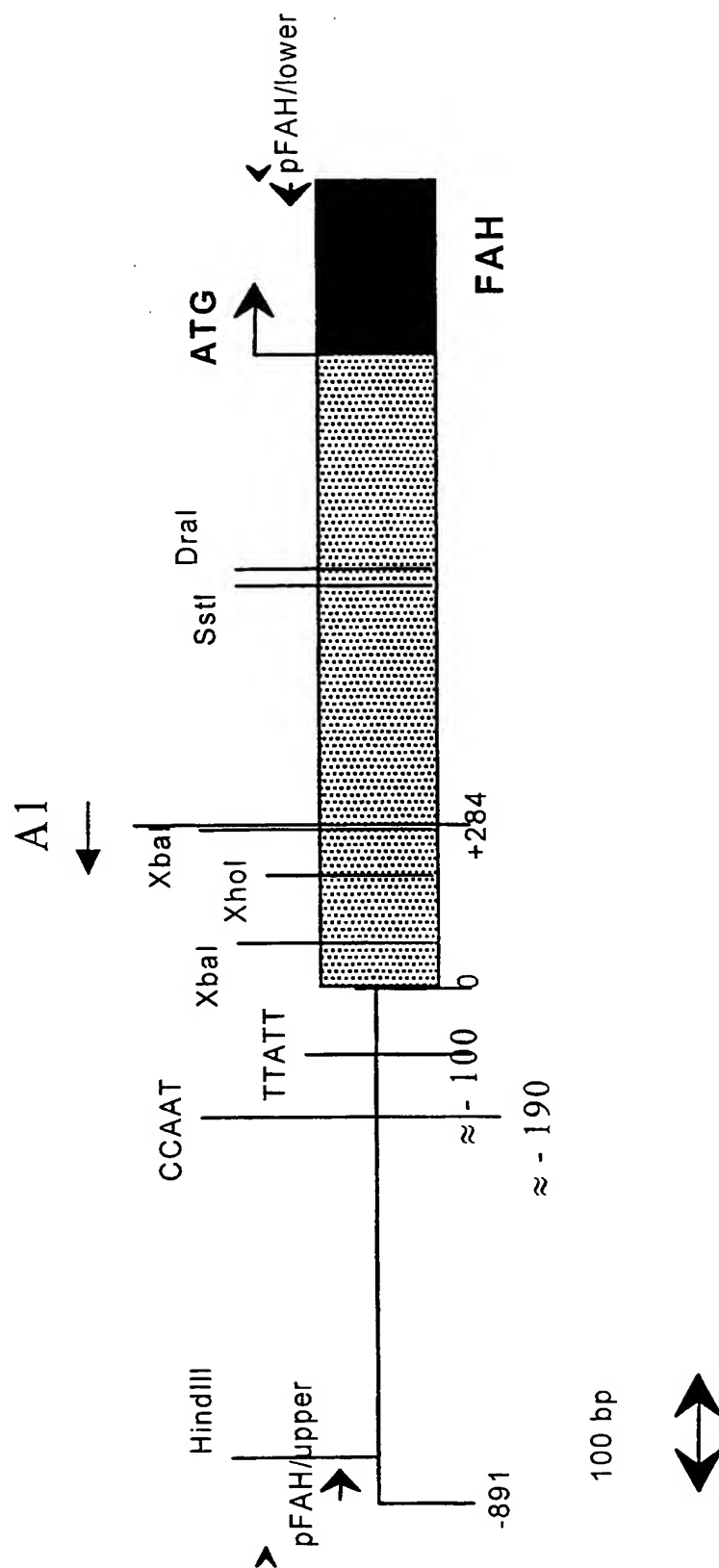


FIGURE 2



3 / 3

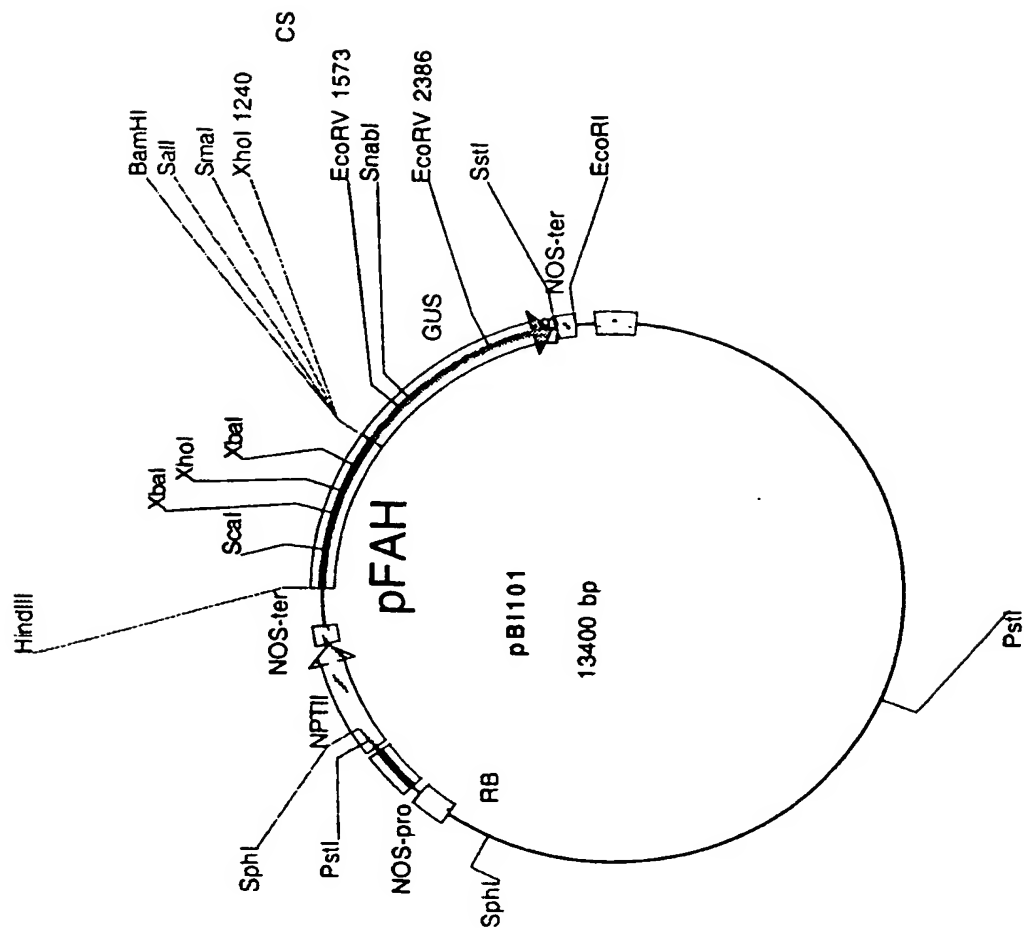


FIGURE 3



## LISTAGE DE SEQUENCE

<110> INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE AGRONOMIQUE - INRA

<120> PROMOTEUR PERMETTANT L'EXPRESSION DE TRANSGENES DANS  
TOUTE LA PLANTE HORMIS DANS LA GRAINE

<130> FAH

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 932

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<223> promoteur de la FAH chez Arabidopsis thaliana.

<400> 1

```

cagctgtagc atcttgatat tgctgatact cagccacaag atcgttcatg ttactctctg 60
cttcattaaa ctccatctcg tccattcctt cttctgtgta ccaatgcaag aaagcttatc 120
tcaacatcag gctgatataa ccaatatctt acttctttta catttgtaa atggaaccaa 180
cccatttttc tggaaaaagt gctaaccaaa catttgatta accgtatcac tactactttc 240
atttctatct tctgtttcat tatgtgact atttaagctc cgttgtcaaa tctctaagtt 300
agacataaaa gacaaagact aatcaattgt catcacacca gcgtcgtcga gtgagctata 360
ttaatcgtgg attttaagca ttaaagaaac attctatagt actaaagcaa ataaaataat 420
tataatcaaa cactatgctt gacactgggc acgtgtactg gtagtgaatg attctacatc 480
ataagaggcc gcatcaaaaat cctaaaaata agcataatga attaatcatt taaaaatttt 540
atcttactca ataagaaaat cgaaagtatg attattatct agctgccaca atcttcgaat 600
ttaatattta ctcaagaaga gaccgacttt aatccttgac tttctcattg ctctatggaa 660
aatgattaaa gcagtcaata aaatcttttg acattgttgg cagaagacca ataattcgaa 720
gtctaaaatg taatcgtcca cacagtgtat gagtacccta gtattttttt tcttttccat 780
ataagttgaa tttgtaatat atatagtgtg atgttggtta tttgtggcaa cgtacaaaat 840
tgggaatcct ataagtgcga cgacaagtga caagacgagg ctatgaacag ctaatgtatg 900
aagagagcca aaagagcaac aacctggcac ag                                     932

```

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce upper

<400> 2

ttcatgttac tctctgcttc

20

<210> 3

<211> 23

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<223> Amorce lower



&lt;400&gt; 3

ggaaaggaaa caaatacgga ttc

23

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 237

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; fatty acid hydroxylase Fah 1p

&lt;400&gt; 4

Met Val Ala Gln Gly Phe Thr Val Asp Leu Lys Lys Pro Leu Val Phe  
1 5 10 15

Gln Val Gly His Leu Gly Glu Asp Tyr Glu Glu Trp Val His Gln Pro  
20 25 30

Ile Ala Thr Lys Glu Gly Pro Arg Phe Phe Gln Ser Asp Phe Trp Glu  
35 40 45

Phe Leu Thr Leu Thr Val Trp Trp Ala Val Pro Val Ile Trp Leu Pro  
50 55 60

Val Val Val Trp Cys Ile Ser Arg Ser Val Ser Met Gly Cys Ser Leu  
65 70 75 80

Pro Glu Ile Val Pro Ile Val Val Met Gly Ile Phe Ile Trp Thr Phe  
85 90 95

Phe Glu Tyr Val Leu His Arg Phe Val Phe His Ile Lys Thr Lys Ser  
100 105 110

Tyr Trp Gly Asn Thr Ala His Tyr Leu Ile His Gly Cys His His Lys  
115 120 125

His Pro Met Asp His Leu Arg Leu Val Phe Pro Pro Thr Ala Thr Ala  
130 135 140

Ile Leu Cys Phe Pro Phe Trp Asn Ile Ala Lys Ala Ile Ser Thr Pro  
145 150 155 160

Ser Thr Ala Pro Ala Leu Phe Gly Gly Gly Met Leu Gly Tyr Val Met  
165 170 175

Tyr Asp Val Thr His Tyr Tyr Leu His His Ala Gln Pro Thr Arg Pro  
180 185 190

Val Thr Lys Asn Leu Lys Lys Tyr His Leu Asn His His Phe Arg Ile  
195 200 205

Gln Asp Lys Gly Phe Gly Ile Thr Ser Ser Leu Trp Asp Ile Val Phe  
210 215 220

Gly Thr Leu Pro Thr Thr Lys Ala Pro Arg Lys Glu Gln  
225 230 235

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 714





&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequence codante pour la fatty acid hydroxylase

Fah 1P

&lt;400&gt; 5

```
atggttgctc agggattcac tgtggatctt aaaaagcccc ttgtatttca ggttggtcat 60
cttggagaag attatgagga atgggttcac caacctatcg cgaccaagga aggccctcgg 120
ttttttcaga gtgacttttg ggagttcttg acacttacag tttggtgggc agttcctgtc 180
atttggttgc cagttgtagt ctgggtgcata tcaaggtcag taagtatggg atgttcactt 240
ccagaaatcg tcccaattgt tgtcatggga atattcatct ggacattttt tgaatacgtt 300
cttcaccggt tcgttttcca cataaaaaacg aagagttact ggggaaacac tgcacactat 360
cttattcacg gatgccatca taagcacccg atggaccacc ttcggctcgt ctttctctct 420
actgcaactg cgattttatg ctttccgttc tggaacattg cgaaggctat ctcaactcct 480
tcaaccgcac ctgcattgtt tggtaggagg atgctcggat atgtgatgta cgatgtcact 540
cattattacc ttcaccatgc ccaacctact agaccagtga ccaaaaatct caagaagtac 600
catttgaatc atcacttcag gattcaggac aaaggatttg gtataacttc gtcgttatgg 660
gacatagtct ttgggacact tcccaccaca aaagcccca gaaaagagca atag 714
```



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/FR 00/01574

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/53 C12N15/82 C12N9/02 C12N5/10 C12Q1/68  
A01H5/00 A01H5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12Q A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, MEDLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GUIVARC'H ANNE MAURO CARNEIRO ET AL: "Tissue-specific expression of the rolA gene mediates morphological changes in transgenic tobacco." PLANT MOLECULAR BIOLOGY 1996, vol. 30, no. 1, 1996, pages 125-134, XP002132241 ISSN: 0167-4412 the whole document	1,4-7, 12-18, 23,24
A	WO 98 44138 A (CAMBRIDGE ADVANCED TECH) 8 October 1998 (1998-10-08) the whole document	19-21

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 October 2000

Date of mailing of the international search report

13/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, T

CT/FR 00/01574

CT/FR 00/01574

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LIN X. ET AL.: "AC 003096"  EMBL DATABASE,  14 November 1997 (1997-11-14),  XP002148976  Heidelberg  the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-3,5
A	<p>MITCHELL A G ET AL: "Fah1p, a  Saccharomyces cerevisiae cytochrome b5  fusion protein, and its Arabidopsis  thaliana homolog that lacks the cytochrome  b5 domain both function in the  alpha-hydroxylation of  sphingolipid-associated very long chain  fatty acids."  JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1997 NOV  7) 272 (45) 28281-8.,  XP002132243  cited in the application  the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-24
A	<p>WO 97 30582 A (CARNEGIE INST OF WASHINGTON  ;MONSANTO COMPANY INC (US); BROUN PIER)  28 August 1997 (1997-08-28)  * the whole document ; pref. Ex.2 *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-24

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01574

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9844138 A	08-10-1998	AU 6845398 A BR 9808430 A CN 1257548 T EP 0977877 A	22-10-1998 23-05-2000 21-06-2000 09-02-2000
WO 9730582 A	28-08-1997	AU 723161 B AU 2050497 A BR 9707624 A CA 2242859 A EP 1009220 A JP 2000506006 T US 5965793 A	17-08-2000 10-09-1997 04-01-2000 28-08-1997 21-06-2000 23-05-2000 12-10-1999



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Deposition internationale No  
PCT/FR 00/01574

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE			
CIB 7	C12N15/53 A01H5/00	C12N15/82 A01H5/10	C12N9/02 C12N5/10 C12Q1/68
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB			
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE			
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12N C12Q A01H			
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche			
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) BIOSIS, MEDLINE			
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées	
A	GUIVARC'H ANNE MAURO CARNEIRO ET AL: "Tissue-specific expression of the rolA gene mediates morphological changes in transgenic tobacco." PLANT MOLECULAR BIOLOGY 1996, vol. 30, no. 1, 1996, pages 125-134, XP002132241 ISSN: 0167-4412 le document en entier ---	1,4-7, 12-18, 23,24	
A	WO 98 44138 A (CAMBRIDGE ADVANCED TECH) 8 octobre 1998 (1998-10-08) le document en entier --- -/--	19-21	
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe			
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets			
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  2 octobre 2000		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  13/10/2000	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Kania, T	

## Le Internationale No

**C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs à la famille de brevets

De l'Organisation Internationale No

PCT/FR 00/01574

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9844138 A	08-10-1998	AU 6845398 A	22-10-1998
		BR 9808430 A	23-05-2000
		CN 1257548 T	21-06-2000
		EP 0977877 A	09-02-2000
WO 9730582 A	28-08-1997	AU 723161 B	17-08-2000
		AU 2050497 A	10-09-1997
		BR 9707624 A	04-01-2000
		CA 2242859 A	28-08-1997
		EP 1009220 A	21-06-2000
		JP 2000506006 T	23-05-2000
		US 5965793 A	12-10-1999



4  
1  
6

1  
1  
2